

Virág László K60780

Kutatásainkban a poli-ADP-riboziláció szerepét vizsgáltuk különös tekintettel a sejthalál és a gyulladás folyamatainak szabályozásában, a sejtmagban zajló poli-ADP-riboziláció és a mitokondriális folyamatok kölcsönhatásának központba állításával.

Eredményeink:

I. Sejthalál

1. Humán és egér sejtek/sejtvonalak felhasználásával modellrendszereket állítottunk be és vizsgáltunk a poli-ADP-riboziláció és a sejthalál kapcsolata szempontjából. A legeredményesebben alkalmazható tesztrendszer az A549 sejtvonal és a sejtvonalban lentivirális géncsendesítéssel létrehozott PARP-1 és PARG knockdown (KD) vonalak válaszainak összehasonlítása bizonyult. Az így létrehozott stabil sejtvonalak vizsgálatával kimutattuk, hogy a poli(ADP-ribóz)-t lebontó PARG és a fő poli(ADP-ribóz) szintetizáló PARP-1 enzim csendesítése hasonló és nem ellentétes irányú eltolódást okoz az oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitásban. Míg enyhe DNS károsodás esetén a PARP1 és a PARG hiány érzékenyít az apoptózissal szemben, intenzív DNS károsodás esetén védelmet nyújt a nekrozissal szemben. Vizsgáltuk a folyamatban a mitokondriális útvonal szerepét is, és azt találtuk, hogy

- A. a mitokondriális dehidrogenázok aktivitásán alapuló viabilitása csökken a hidrogén peroxiddal kezelt sejteknek, ami ellen védelmet nyújt az PARP1 és PARG KD fenotípus.
- B. A PARP1/PARG összehangolt működése szükséges a mitokondriális membrán depolarizációjához
- C. A TCA ciklus szubsztrátjai védelmet nyújtottak a sejthalállal szemben, ami a glikolízis lelassulását jelzi.
- D. A sejthalál közvetítésében nem vesz részt a mitokondriális apoptózis mediátor AIF (apoptózis indukáló faktor) (szemben más, pl. neuronális kultúrákon tapasztaltakkal)

E munkánk a FASEB Journal-ben jelent meg.

2. Az általunk korábban legrészletesebben jellemzett timocita rendszerben vizsgáltuk a protein kináz C (PKC) szerepét a PARP aktiváció és az általa közvetített sejthalál szabályozásában. Kimutattuk, hogy a PKC aktivációja a PARP gátlása révén véd az oxidatív stressz toxikus hatásával szemben. Kimutattuk, hogy a PKC-t aktiváló forbolésterekkel kezelt sejtkben az immunprecipitált PARP-1 foszforilálódik. Úgyszintén igazoltuk, hogy a

tisztított PKC foszforilálja a tisztított rekombináns PARP-1-et. Megvizsgáltuk, hogy a PARP1 PKC általi foszforilációja és a következményes citoprotekció csupán thymocytákban, vagy más sejttípusokban is megfigyelhető. Azt találtuk, hogy az érett lymphocytákban (lépsejtek) hasonlóan működik ez a szabályozás, de epitheliális sejtvonalakon nem tudunk hasonlót megfigyelni. Igazoltuk továbbá, hogy nemcsak forbolészter stimulációra, hanem az igazoltan PKC aktiváción keresztül ható mitogén konkanavalin A is PARP gátlást és citoprotekciót eredményezett oxidatív stimulusokkal és MNNG DNS alkiláló kezeléssel szemben.

E munkánk a FEBS Letters-ben jelent meg.

3. Egy DNS alkiláló hatású vegyülettel, az MNNG-vel kezelt sejtekben is kimutattuk a peroxinitrit képződését jelzőnitrotirozin jelenlétét. MNNG-vel kezelt timocitákon iNOS nem expresszálódik, viszont az MNNG vizes oldatban NO-t bocsájt ki, mely endogen szuperoxiddal kombinálódhat, és így jöhet létre peroxinitrit. Az MNNG által kiváltott timocita sejthalál modellben is jellemeztük a PARP szerepét (DNS törés, PARP aktivitás esszé, mitokondriális paraméterek, DNS fragmentáció, kaszpáz aktiváció, membránintegritás). Megállapítottuk, hogy bár az MNNG által kiváltott sejthalál lényegében azonos mechanizmussal játszódik le mint a peroxinitrit által stimulált sejthalál, az MNNG-vel kezelt sejtekben keletkező, kis mennyiségű peroxinitrit abban nem vesz részt.

E munkánk a Toxicology Letters-ben jelent meg.

4. Vizsgáltuk a H1.2 hiszton variáns lehetséges szerepét a sejthalál szabályozásában, de az általunk kipróbált modellrendszerek egyikében sem tapasztaltunk érdemi transzlokációt. A p53 és az általa regulált sejthalálmediátorok (PUMA, NOXA, PERP; expressziójukat mRNS szintjén RT-PCR-rel vizsgáltuk) szerepét szintén tanulmányoztuk, de ezek az eredményeink egyelőre ellentmondásosak.

5. A direkt oxidatív stressz modellben kapott kedvező fogadtatásra találó eredményeinken új projektek elindítását indukálták. Ezek keretében a sejteket nem oxidatív stresszágenssel kezeljük, hanem olyan exogén noxával, ami ismertén másodlagos gyöktermelést stimulál. Így elkezdtek vizsgálni

A) a TNF citotoxikus hatását a géncsendesített A549 sejtvonalakon, és fokozott apoptózist tapasztalunk a PARP1 KD sejtekben.

B) az UV sugárzás citotoxikus hatását keratinocytákon farmakológiai PARP gátlók jelenlétében, és kezdeti eredményeink alapján valószínűleg újraértelmezendők lesznek az irodalomban e témában megjelent munkák

C) a dohányfüst hatását A549 sejtekre (a megfelelő KD vonalak összehasonlításával). Cigarettafüst hatására mitokondriális szuperoxidgyök termelődése, DNS törés, PARP aktiváció és sejthalál mutatható ki. Vizsgáljuk a PARP aktivációt kiváltó szabadgyök fajtáját és a PAR szignalizáció szerepét a sejthalálban.

II. Gyulladások

Ismert a PARP1 szerepe a gyulladásos mediátorok expressziójának szabályozásában. Ezt a jelenséget vizsgáltuk

A) a fent leírt lentivirális PARP1 és PARG csendesített sejtvonalakon. TNF α - stimulust követően qPCR arrayvel hasonlítottuk össze a kontrol PARP KD és PARG KD sejtvonalak gyulladásos citokin és kemokin expresszióit. Az eltérő expressziós mintázatok mechanizmusának vizsgálata folyamatban van.

B) In vivo gyulladásmodellben: oxazolonnal kiváltott kontakt hiperszenzitivitásban azt találtuk, hogy a PARP gátlás csökkenti a granulociták migrációját, gátolja a matrix metalloproteinázok aktivációját és ezáltal gátolja a gyulladást. Mint a PARP1 knockout állatok vizsgálatából megtudtuk, a PARP izoformák közül a PARP1 felelős a hatásért, míg a PARP2 kiütése (knockout) nem változtatta meg a gyulladásos választ. A PARP1 állatokban csökkent NF κ B és ATF2 aktivációt mértünk, ami felelős lehet a csökkent gyulladásos válaszáért.

A farmakológiai PARP gátlás hatásainak vizsgálata a szakterület első számú lapjában, a J. Invest. Dermatol.-ban jelent meg, a knockout állatokon kapott eredményeinket bemutató kéziratunkat ugyanide küldtük be közlésre.